

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/00, A61K38/19, A61K38/20, A61K39/39, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/00, A61K38/19, A61K38/20, A61K39/39, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOTECHABS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 690125, A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH), 03 January, 1996 (03.01.96) & JP, 8-9967, A & US, 5874307, A	1-6
A	WO, 96/01611, A1 (BAXTER INT. INC.), 25 January, 1996 (25.01.96), & JP10-502638, A & EP, 769932, A1	1-6
A	WO, 90/11085, A1 (MEDICAL BIOLOGY INST.), 04 October, 1990 (04.10.90), & JP4-501853, A & EP, 422164, A1 & US, 5045320, A	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 April, 2000 (24.04.00)Date of mailing of the international search report
02 May, 2000 (02.05.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

15

2

1

.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/00, A61K38/19, A61K38/20, A61K39/39, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/00, A61K38/19, A61K38/20, A61K39/39, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOTECHABS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 690125, A2 (THE INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH) 3. 1月. 1996 (03. 01. 96) & JP, 8-9967, A & US, 5874307, A	1-6
A	WO, 96/01611, A1 (BAXTER INT. INC.) 25. 1月. 1996 (25. 01. 96) & JP10-502638, A & EP, 769932, A1	1-6
A	WO, 90/11085, A1 (MEDICAL BIOLOGY INST.) 4. 10月. 1990 (04. 10. 90) & JP4-501853, A & EP, 422164, A1 & US, 5045320, A	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 04. 00

国際調査報告の発送日

02.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

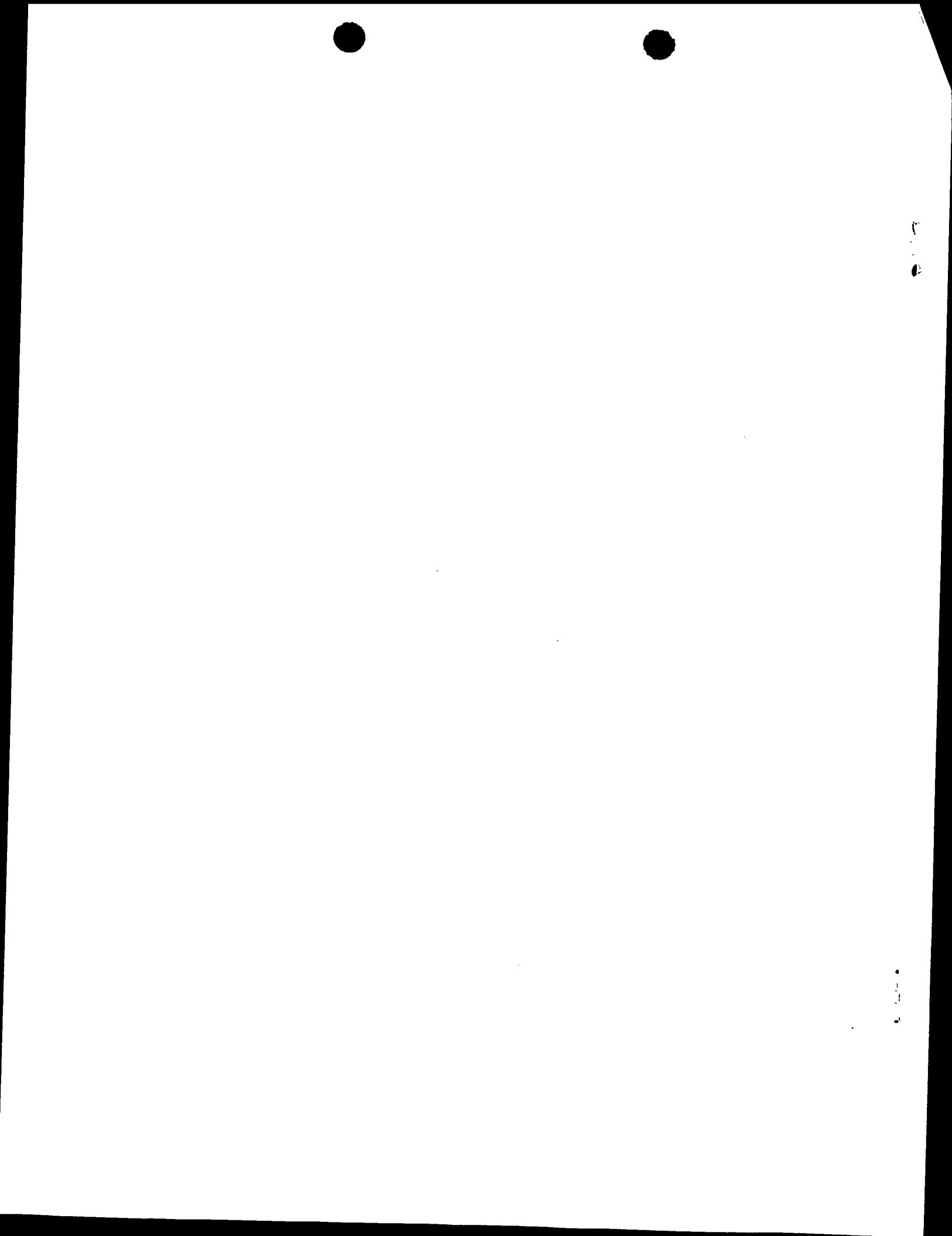
森井 隆信

印

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 A61K 39/00, 38/19, 38/20, 39/39, A61P 35/00		A1	(11) 国際公開番号 WO00/47226
			(43) 国際公開日 2000年8月17日(17.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00692	(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) レオン カム (LEONG, Kam) [US/US] 21043 メリーランド州 エリコットシティ プレコンシャイア ロード 10242 Ellicott City, (US) リュウ シュウチン (LIU, Shu Qin) [CN/US] 21211 メリーランド州 バルチモア ビーチ アベニュー 3522 アパートC MD, (US)	2000年2月9日(09.02.00)	
(22) 国際出願日	(74) 代理人 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)	1999年2月9日(09.02.99)	
(30) 優先権データ 特願平11/31197	(81) 指定国 CA, CN, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) ジョンズホプキンス大学 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) [US/US] 21205 メリーランド州 バルチモア ルットランド アベニュー 720 MD, (US)	添付公開書類 国際調査報告書		
(71) 出願人 ; および (72) 発明者 大野忠夫 (OHNO, Tadao) [JP/JP] 〒300-1234 茨城県牛久市中央1丁目18番地12 Ibaraki, (JP) ペン バオガン (PENG, Bao Gang) [CN/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台3丁目1番地1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP)			
(54) Title: TUMOR VACCINES			
(54) 発明の名称 腫瘍ワクチン			
(57) Abstract Tumor vaccines containing fine particles or dissolved matters prepared from a solidified tumor material selected from the group consisting of tumor tissues, tumor cells and components thereof and at least one cytokine and/or a cytokine inducer (for example, granulocyte macrophage colony-stimulating factor and/or interleukin 2, etc.) optionally together with an adjuvant. These vaccines are characterized in that they can be easily handled, are widely applicable to the prevention of recurrence, prevention of metastasis and treatment of any tumor regardless of type, and have a high antitumor effect.			

(57)要約

腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化され
た腫瘍材料から調製された微粒子又は溶解物、少なくとも一種のサイトカイン
及び／又はサイトカイン誘導剤（例えば、顆粒球・マクロファージコロニー刺激
因子及び／又はインターロイキン-2など）、及び必要に応じてアジュバントを含
む腫瘍ワクチン。簡便に取り扱うことができ、腫瘍の種類を問わずに再発防止、
転移阻害、及び治療に適用できる汎用性を有し、しかも抗腫瘍効果が高いという
特徴がある。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LR リベリア	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LS レソト	SI スロベニア
AU オーストラリア	FR フランス	LT リトアニア	SL スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LV ルクセンブルグ	SN シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	MA モロッコ	SZ セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	MC モナコ	SW スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MD モルドヴァ	TG チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MG マダガスカル	TD トーゴ
BG ブルガリア	GN ガンビア	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GR ギリシャ	ML マリ	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GW キニア・ビサオ	MN モンゴル	TR トルコ
BY ベラルーシ	HR クロアチア	MR モーリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HU ハンガリー	MW マラウイ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	ID インドネシア	MX メキシコ	UA ウクライナ
CG コンゴ	IE アイルランド	NE ニジェール	UG ウガンダ
CH スイス	IL イスラエル	NZ ニュージーランド	US 米国
CI コートジボアール	IN インド	NO ノールウェー	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	PL ポーランド	VN ヴェトナム
CM カメルーン	IT イタリア	PT ポルトガル	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	JP 日本	RO ルーマニア	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア		ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン		
DE ドイツ	KP 北朝鮮		
DK デンマーク	KR 韓国		

明 細 書

腫瘍ワクチン

技術分野

本発明は、腫瘍の再発予防、転移阻害、及び治療に有用な腫瘍ワクチンに関する。

背景技術

腫瘍ワクチン療法は、体内における免疫機能、なかでも細胞性免疫反応の中心的役割をはたすキラーリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球（以下、「CTL」と略す。）を活性化して、正常細胞を傷害することなく腫瘍細胞を特異的に殺し、腫瘍の再発を防止し、転移を阻害し、あるいは既存腫瘍の治癒を期待する療法である。

腫瘍ワクチンとしては多種類が開発されている (Pardoll, D.M., Nature Med., 4(5 Suppl), pp.525-531, 1998)。大まかに分類すれば、腫瘍特異的なものとして、(1)すでに性状が明らかになっている腫瘍抗原ペプチドを用いるもの；(2)未同定の腫瘍抗原ペプチドが含まれる腫瘍組織の抽出液を用いるもの；(3)これらを抗原提示細胞、特に強力な抗原提示機能がある樹状細胞に結合させたもの (Nestle, F.O., et al., Nature Med., 4, pp.328-332, 1998)；(4)樹状細胞に腫瘍抗原タンパクを取り込ませ負荷したもの；(5)樹状細胞と腫瘍細胞を融合させたもの；(6)腫瘍抗原をリボソームに結合させ、リボソームごとに取り込ませるもの (Nakanishi, T., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 240, pp.793-797, 1997)；(7)腫瘍細胞そのものを放射線や固定剤で不活性化処理して投与するもの；(8)遺伝子治療法で、抗原提示細胞刺激効果あるいはリンパ球刺激効果があるサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それをワクチンとして投与するもの、又は腫瘍抗原遺伝子を適切な細胞に導入し、その遺伝子を発現している腫瘍細胞

をワクチンとして投与するもの；(9)腫瘍抗原遺伝子をウイルス又は細菌に組み込み患者に感染させるもの；(10)生きている腫瘍細胞、腫瘍抗原ペプチドあるいは腫瘍細胞抽出液を投与し、別途、サイトカインを大量投与するか (Rosenberg, S. A., et al., Nature Med., 4, pp.321-327, 1998)、あるいはサイトカインを徐放性に製剤化して投与するもの (Golumbek, P. T., et al., Cancer Res., 53, pp.5841-5844, 1993) などがある。

しかしながら、上記の腫瘍ワクチンにはいずれも一長一短がある。例えば、方法(1)は、同定された腫瘍抗原ペプチドがあてはまる特定の主要組織適合抗原 (以下、「MHC」と略し、Class I の場合は「MHC-I」、Class II の場合は「MHC-II」と記載する。) を発現する腫瘍にしか適用できない。ヒトの MHC の種類は膨大であり、当該腫瘍抗原ペプチドがあてはまる症例は極めて限定的である。この難点を克服するため、未同定の腫瘍抗原ペプチドが含まれる腫瘍組織の抽出液を使用する方法(2)が開発されたが、腫瘍組織から抽出できる腫瘍抗原ペプチドの量は極微量であり、原材料となる腫瘍量が少ない場合には濃縮できない場合が多い。この結果、同定され合成された腫瘍抗原ペプチドのように大量に投与できず、その効果も限定されてしまう。

方法(3)のように、あらかじめ腫瘍抗原ペプチドを抗原提示細胞に結合させれば、CTL の活性化効果は高い。しかし、抗原提示細胞、中でも強力な抗原提示能力のある樹状細胞を分離調製するための抹消血や骨髓は、危険な移植片対宿主間拒絶反応 (以下、「GVHD」と略す。) を避けるため、腫瘍ワクチン療法の適用対象である腫瘍を持つ患者本人からでなければならず、高度の技術を要し煩雑である。方法(4)及び(5)も方法(3)と同じ問題を有しており、方法(5)は融合操作が極めて煩雑である。方法(6)では GVHD の危険性を配慮する必要はないが、腫瘍抗原の抗原提示細胞への導入効率は必ずしも高くはなく、また腫瘍ワクチン作製のため比較的大量の腫瘍抗原が必要である。

方法(7)も腫瘍細胞を大量培養で取得するために煩雑でコストがかかるうえ、腫瘍細胞そのものに含まれる腫瘍抗原量が微量であるという問題がある。また、

この方法は、抗原性の高い腫瘍細胞ではポリ-L-リジン処理を追加すれば成功する場合が知られているが (Naito, M. and Seno, S., Cell Biol. International Rep., 5, pp.675-681, 1981)、抗原性の低い腫瘍細胞では成功しない。方法(8)及び(9)の遺伝子治療は、治療操作はもちろん、治療に至る認可取得手続きが煩雑極まりない。現段階では方法(10)が有望であるが、特に Rosenberg らの方法では、同時に投与される大量のインターロイキン-2の副作用が厳しく、必ずしも腫瘍の臨床成績は高くない。Golumbek らの方法でサイトカインを徐放製剤化した場合でも、放射線処理した生きている腫瘍細胞を調製する煩雑さが残っている。

腫瘍ワクチンは極力簡便に取り扱える形態が望ましい。その点で、生きている腫瘍細胞または抗原提示細胞をワクチンの一部として投与する方法は、生かした状態での操作が必要なため、技術的に非常に煩雑になるという問題がある。まして遺伝子治療となれば操作は一段と煩雑である。腫瘍抗原ペプチドが判明している場合には、それを大量に合成して投与できるものの、腫瘍抗原ペプチドは非常に多くの種類があり、患者個人の MHC に拘束されるためもあって、どの腫瘍抗原ペプチドが対象となる患者個人に適用できるかが判然としない場合が多く、適用は限定される。腫瘍抗原ペプチドではなく腫瘍抗原タンパクを用いる場合には、そのタンパクが抗原提示細胞内で処理され MHC に合う腫瘍抗原ペプチドが選別されてくるため、適用される患者個人の MHC に拘束されることはないが、腫瘍抗原タンパク自体の精製及び大量調製が難しいという問題がある。

一方、CTL の誘導方法として、病理切片を脱パラフィン処理して得た固定腫瘍組織の上で抹消血単核細胞分画から CTL を誘導する方法が知られている (Liu, S.Q. et al., Nature Med., 2, pp.1283-1283, 1996)。また、通常、溶解状態の抗原タンパクを抗原提示細胞に与えても、MHC-II に抗原タンパク由来の抗原ペプチドが結合されて抗体作製につながる液性免疫を刺激する効果が高く、MHC-I に抗原タンパク由来の抗原ペプチドが結合されキラー細胞を活性化する細胞性免疫反応を刺激する効果は低い。Falo らは異種タンパクで強烈な抗原である卵白アルブミンを鉄粉に結合させて、アジュバントを加えずにマウスに注射し、卵白

アルブミン由来の抗原ペプチドに反応する CTL を誘導した (Falo, Jr., L.D., et al., Nat. Med., 1, pp.649-653, 1995)。

本発明者らは、溶解性の腫瘍抗原タンパクを微小なポリスチレンビーズ上に固定し、in vitro 細胞培養系で、微小固形物としてヒト抹消血単核細胞分画中の抗原提示細胞に貪食させたところ、同一人の抹消血リンパ球から効率よく CTL を誘導できることを見出した (Kim, C., et al., Cancer Immunol. Immunother., 47, pp.90-96, 1998)。また、死細胞由来の抗原は、死細胞の状態で未成熟な樹状細胞に貪食された場合、免疫反応を惹起できる効率は、貪食されない場合に比べて数千倍に達することが知られている (稲葉：1998 年 12 月 2 日、日本免疫学会、演題 SI-3-3)。

発明の開示

本発明の課題は、簡便に取り扱うことができ、腫瘍の種類を問わずに再発防止、転移阻害、及び治療に適用できる汎用性を供え、しかも抗腫瘍効果が高い腫瘍ワクチンを提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、腫瘍組織、腫瘍細胞、又はこれらの成分を固定操作により固体化した材料を用い、この材料を抗原提示細胞が貪食できる大きさに微粒子化するか、あるいは溶解操作により溶解し、さらに少なくとも一種類のサイトカインと組み合わせて腫瘍ワクチンとして用いることにより、高い有効率をもって腫瘍の再発防止、転移阻害、及び治療を達成できることを見出した。

すなわち本発明は、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された微粒子と、少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤とを含む腫瘍ワクチン；並びに、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された溶解物と、少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤とを含む腫瘍ワクチンを提供するものである。

本発明の好ましい態様によれば、非特異的に免疫反応を惹起するアジュバントをさらに含む上記腫瘍ワクチン；体内の同一局所に投与するための上記腫瘍ワクチン；サイトカインとして徐放性サイトカイン製剤を含む上記腫瘍ワクチン；及びサイトカインとして顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子及び／又はインターロイキン-2を含む上記腫瘍ワクチンが提供される。別の観点からは、少なくとも一種類のサイトカインと組み合わせて用いるための腫瘍ワクチンであって、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された微粒子又は該腫瘍材料から調製された溶解物を有効成分として含むワクチンが提供される。

さらに別の観点からは、腫瘍の治療方法、再発予防方法、及び転移阻害方法であって、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された微粒子、及び少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤の有効量を患者に投与する方法；腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された溶解物、及び少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤の有効量を患者に投与する方法；同一局所に繰り返し投与を行なう上記方法；並びに、上記腫瘍ワクチンの製造のための固体化された上記腫瘍材料から調製された微粒子又は溶解物の使用が提供される。

なお、本発明の完成にあたり、本発明者は米国政府より援助を受けており、従って米国政府は本件発明に関して権利を有する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の腫瘍ワクチンを用いてインビトロ感作により誘導した CTL の活性を示す。図中、縦軸の % Lysis は CTL の標的細胞の殺傷活性を示し、横軸の E/T ratio は4時間 Cr-51 遊離法による殺傷活性測定時の CTL 数と標的細胞数の比を示す。また、□は B16-F10；△は Hepa1-6；▲は Lewis lung carcinoma を示す。

第2図、例4において溶解固定腫瘍細胞を用いて製造した腫瘍ワクチンによるインビボ感作実験の結果を示す。図中、○はPBS対照群；□は腫瘍ワクチン1回投与群；■は腫瘍ワクチン3回投与群を示す。

第3図は、例5において、培養リンパ球と標的腫瘍細胞の比(E/T ratio)を変えて細胞殺傷活性を検討した結果を示す。図中、●はPBS対照群；■は腫瘍ワクチン投与群；□は別種の対照群(X線50Gyを予め照射した生きているB16-F10細胞+GM-CSF マイクロスフェア投与群)を示す。

第4図は、例6において用いた各種の腫瘍ワクチンの細胞殺傷活性の結果を示す。図中、●はPBS投与群；○はHA-A20細胞投与群；□はGM-CSF マイクロスフェアを混合していない腫瘍ワクチン投与群；▲はX線50Gyを予め照射した生きているGM-CSF-HA-A20細胞投与群；△はGM-CSF マイクロスフェアを混合した腫瘍ワクチン投与群を示す。

第5図は、本発明の腫瘍ワクチンによる細胞殺傷活性が、マウスCD8に対するモノクローナル抗体により阻害される結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の腫瘍ワクチンは、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製される微粒子又は溶解物を腫瘍抗原として含み、さらに少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤とを含むことを特徴としている。

腫瘍細胞又は腫瘍組織としては、例えば哺乳類動物、好ましくはヒト由来のものを用いることができるが、治療や予防の対象となる腫瘍の腫瘍抗原を含む細胞又は組織であれば、いかなる生物種のもので用いてもよい。腫瘍組織は、腫瘍細胞を含む組織であれば特にその種類は限定されない。また、腫瘍組織又は腫瘍細胞の成分を用いる場合には、腫瘍抗原となりうる物質を含むものであればその種類は限定されない。固形癌組織、骨髓、白血球など、生体から分離又は採取された癌細胞を含む生体試料を腫瘍材料として用いることができる。腫瘍組織又は腫瘍細胞

胞の成分としては、例えば、抗原ペプチドや抗原蛋白を用いることができる。

固体化された腫瘍材料を調製するための固定方法は特に限定されず、当業者に利用可能ないかなる手段を採用してもよい。例えば、組織固定剤を用いる場合には、中性ホルマリン、グルタルアルデヒド、メタノール、エタノール等のアルコール類等を用いることができるが、これらの他にも生体組織若しくは細胞、又はそれらの成分を固体化できる方法であればどのような方法を用いてもよい。腫瘍材料をパラフィン埋没や凍結などの方法により固体化してもよい。骨組織など本来固体状態の組織を固体化腫瘍材料として用いる場合にも、適宜の固定方法を行なうことが望ましい。

微粒子の調製方法は特に限定されないが、例えば、固体化した腫瘍組織を破碎して微細な断片である微粒子を調製する方法のほか、腫瘍組織の破碎断片や腫瘍細胞を溶解して固体微粒子に固定する方法、又は抗原ペプチドや抗原タンパクなどの溶解性腫瘍抗原を固体微粒子に固定する方法などを採用することができる。固体微粒子としては、例えば、直径 0.05 ミクロンから 1000 ミクロン程度の鉄粉、炭粉、ポリスチレンビーズ等を用いることができる。また、組織の破碎断片、腫瘍細胞、又は溶解性腫瘍抗原をリボソーム等の脂質粒子に結合させ、抗原提示細胞が微粒子として認識して貪食し得るようにしたものや、溶解性腫瘍抗原自体を結合剤又は架橋剤によって相互に結合させて微粒子化したものを用いてもよい。

微粒子の大きさは特に限定されないが、体内において貪食能力のある細胞が貪食可能なサイズであることが望ましい。本来微小な単個細胞状態の固定腫瘍細胞は特に破碎する必要はないが、細胞の固定化操作で凝集した場合には破碎又は分散処理を施すことが望ましい。破碎又は分散処理には、ホモジェナイザー処理、超音波処理、消化酵素による部分消化法等を用いることができる。また、空隙の大きさが 1000 ミクロン以下のメッシュ、好ましくは 380 ミクロン以下のメッシュを通過させることによって微粒子を調製することもできる。これらの微粒子の調製方法は当業者に周知であり、当業者は適宜の方法を単独で、又は複数の方法を組み合わせ微粒子を調製することができる。

固体化された腫瘍材料から溶解物を調製する方法としては、例えば、タンパク分解酵素を用いる方法を採用することができる。タンパク分解酵素としては、例えばプロナーゼKが挙げられる。また、タンパク分解酵素以外の酵素、酸、又はアルカリ等を適宜組み合わせた方法でもよい。固体化された腫瘍材料を溶解できるものであればいかなる方法を採用してもよく、当業者が適宜の方法を選択することが可能である。溶解物を上記の固体微粒子に固定化してもよい。

本明細書において用いられる「溶解物」という用語は、固体化された腫瘍材料が水、生理食塩水、緩衝液などの水性媒体中に肉眼で固形物が認められない程度に分散した状態を意味しており、その分散物が抗原提示細胞に貪食され得る程度のものであればよいが、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。なお、固定化された腫瘍材料の調製方法、微粒子の調製方法、及び溶解物の調製方法の詳細は本明細書の実施例に具体的に示されているので、当業者は上記の一般的な説明及び実施例の具体的説明を参照しつつ、必要に応じてこれらの方法に適宜の修飾ないし改変を加え、所望の微粒子又は溶解物を調製することが可能である。

本発明の腫瘍ワクチンに含まれるサイトカインの種類は特に限定されず、1種又は2種以上のサイトカインを用いることができる。例えば、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（以下、「GM-CSF」と略す。）又はインターロイキン-2（以下、「IL-2」と略す。）を用いることが好ましく、GM-CSF と IL-2 とを組み合わせ用いることも好ましい。また、体内局所の免疫担当細胞を刺激し、結果的に GM-CSF 及び／又は IL-2 を投与した場合と同様な状況を実現できる他のサイトカインやサイトカイン誘導剤を用いることもできる。これら2種類のサイトカイン以外のサイトカイン又はサイトカイン誘導剤としては、例えば、インターロイキン 12、インターロイキン 18、インターフェロン類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

これらのサイトカインや誘導剤は、投与局所における濃度をなるべく長期間高い状態に保てるように徐放性製剤として調製されていることが好ましい。そのよ

うな徐放化手段は、例えば Golumbek らにより報告されているが (Golumbek, P. T., et al., Cancer Res., 53, pp.5841-5844, 1993)、当業界では種々の徐放化方法が知られており、いかなる方法を採用してもよい。

本発明の腫瘍ワクチンは、非特異的免疫反応を惹起するアジュバントを含んでもよい。アジュバントは一種又は2種以上を組み合わせ用いることができる。アジュバントとして、例えば、Freund Complete Adjuvant、Freund Imcomplete Adjuvant、BCG 等の細菌製剤、ツベルクリン等の細菌成分製剤、keyhole limpet hemocyanine や酵母マンナン等の天然高分子物質、Alum、TiterMax Gold 等の合成アジュバント製剤等が挙げることができるが、これらの具体例に限定されることはなく、アジュバントとしての効果を有する物質であればいかなるものを用いてもよい。アジュバントを用いるか否かは、投与局所の炎症性反応の強さや、投与した結果として惹起される抗腫瘍効果の強さを指標として判断することができる。例えば、アジュバントを含む腫瘍ワクチンと、アジュバントを含まない腫瘍ワクチンを同一局所に交互に投与することも可能である。

本発明の腫瘍ワクチンの製剤形態は特に限定されないが、局所投与に適するような製剤形態であることが望ましい。製剤化の方法も特に限定されず、当業界で利用可能な方法を単独で、又は適宜組み合わせ用いることにより、所望の形態の製剤を調製することができる。製剤化にあたっては、注射用蒸留水や生理食塩水などの水性媒体のほか、当業界で利用可能な製剤用添加物を1種又は2種以上用いることができる。例えば、緩衝剤、pH調節剤、溶解補助剤、安定化剤、無痛化剤、及び防腐剤などを用いることができるが、これらの具体的成分は当業者に周知されている。また、腫瘍ワクチンを凍結乾燥製剤などの固体製剤として調整し、用時に注射用蒸留水などの溶解剤を加えて注射剤を調製することもできる。

本発明の腫瘍ワクチンを用いてワクチン療法を行なうにあたっては、腫瘍ワクチンの単回のみ投与してもよいが、腫瘍抗原とサイトカイン又はサイトカイン誘導剤とをなるべく長い時間共存させるために、体内の同一局所に投与を繰り返すことが望ましい。例えば、投与局所の炎症性反応が惹起され、免疫細胞が集中し

てそこに存続する状態となるように、両成分が3時間以上共存していることが望ましい。アジュバントを含まない腫瘍ワクチンを投与する場合には、アジュバントを同一局所に投与してもよい。一般的には、腫瘍材料の由来する患者に腫瘍ワクチンを投与することができるが、病理診断上、腫瘍材料に含まれる腫瘍抗原と同種又は近縁種の腫瘍抗原を含む腫瘍の患者に投与することも可能である。

投与する局所は特に限定されないが、例えば皮内、皮下、筋肉内、リンパ節内、脾臓等の主要臓器内であって、サイトカイン等が簡単には拡散消失しにくい場所が好ましい。もっとも、腫瘍ワクチンの有効成分が容易に拡散しないような剤型を選択することにより任意の部位の局所投与が可能になる場合もあり、またドラッグ・デリバリー・システムを応用することによって全身投与が可能になる場合もある。本発明の腫瘍ワクチンの投与量及び投与期間は特に限定されないが、ワクチン療法の効果を確認しつつ、適宜投与量と投与期間を決定することが望ましい。投与は、例えば注射等により行なうことができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：本発明の腫瘍ワクチンの作用

抗原性が低いことが広く知られている同系移植マウス肝癌(Guo, Y. J., et al., Nat. Med. 3:451-5, 1997)を対象に、腫瘍抗原としての固定腫瘍細胞、GM-CSF、IL-2、及びアジュバントを組み合わせた腫瘍ワクチンが肝癌形成を阻害できるか否かを検討した。

[方法]

1. 固定腫瘍細胞

C57BL/6に発症した肝癌細胞Hepa 1-6（理化学研究所細胞開発銀行より入手）を培養し、これをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（以下、「PBS」と略す。）に溶解した3%パラホルムアルデヒド溶液で2時間固定した。固定細胞を70%アルコ

ールで一度洗浄滅菌してから、無菌的に PBS で 4 回洗浄し、さらに 10% のウシ胎児血清を含むダルベッコの最少必須培地（以下、「DMEM」と略す。）を加え、炭酸ガスインキュベーターにて、37°C で 2 日間インキュベートした。この培地を除去後、細胞層にポリ-L-リジン水溶液（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加し、2 時間室温放置した後、PBS で 4 回洗浄した。この後、細胞をスクレーパーでかきとり、PBS にて 1.25×10^8 個/ ml に希釈した。固定 Hepa 1-6 細胞はすべて 100 ミクロン以下のサイズであり、貪食能力のある抗原提示細胞が貪食可能なサイズである。

2. サイトカインマイクロスフェアの作製

マイクロスフェア化すべきサイトカインとしてマウス GM-CSF またはヒト IL-2（いずれも Immunex 社製）を用いた。ヒト血清アルブミン注射液（25% 濃度のもの、Albuminar-25, Centeon L.L.C. 製, Illinois, USA）を二回蒸留水で 5% に希釈し、塩酸にて pH 3.0 に合わせた。さらに 2.5% に希釈してから、0.22 ミクロンの孔径を持つフィルターを通して除菌した。100 μg の GM-CSF、または 10^6 国際単位 of IL-2 を 5 ml-遠心管に加え、つぎに注射用ヘパリン溶液（病院用市販品で 1000 単位/ ml 、Elkins-SINN, Inc, NJ, USA）を 1 ml いれ、これをボルテックスミキサーで攪拌しつつ、上述の 2.5% ヒト血清アルブミン注射液 (pH 3.0) を 1 ml 添加した。30 秒以上攪拌を続けた後、形成された微粒子を遠心して回収した。この上澄みから、包埋効率を算定した。

微粒子のペレットを二回蒸留水 2 ml に懸濁して、これに 0.22 ミクロンの孔径を持つフィルターを通し除菌した 20 mg/ml の濃度の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide（以後、「EDC」と略す。）溶液を 0.8 mg/ml となるように添加した。これを 25°C で 15 分間保存、さらに無菌の 2 ml の 0.1M glycine 溶液を添加した。25°C で 30 分間保存後、安定なマイクロスフェアが発生したこの懸濁液を、半径 12 cm の水平ローターにて 2000 rpm、10 分間遠心し、マイクロスフェアを沈殿させて回収した。これに二回蒸留水を適量加え懸濁し、遠心操作を繰り返して計 6 回洗浄した。その後、20 μl 懸濁液に 1 μg の GM-CSF（ 10^6 国際単位に相当）、または 10^3 国際単位 of IL-2 を含むように

生理食塩水に懸濁させた。

3. 感作と腫瘍拒絶反応の測定

上記1. で調製した固定Hepa 1-6細胞、上記2. で調製したGM-CSF マイクロスフェアと IL-2 マイクロスフェア、アジュバントとして市販されている TiterMax Gold (CytRX, Atlanta, Norcross, GA) を混合して腫瘍ワクチンとした。それぞれの量は腫瘍ワクチン 0.05 ml につき、順に 1.25×10^6 個、 10^6 単位、 10^3 国際単位、20 μ l である。これらの構成製剤の組み合わせを変えた腫瘍ワクチンも作製した。組み合わせは表1、表2、表3にそれぞれ記載した。

腫瘍ワクチンを、Hepa 1-6 細胞とは同系 (syngeneic) の関係にある 6-8 週齢の C57BL/6 雄マウス尾の付け根部位の皮内に、1匹あたり 0.05 ml 注射した。1群5匹とした。対照群の5匹の C57BL/6 雄マウスには PBS を 0.05 ml 注射した。7日後、この投与をもう一度同一部位に行い、さらに7日後、0.05 ml の PBS に懸濁した培養 Hepa 1-6 生細胞 10^7 個を直接肝臓内（最大肝葉の被膜直下）に注射した。この 21 日後、形成された肝癌組織のサイズを計測し、その容積を算出した。

[結果]

表1に示すように、対照群では全てのマウスに肝癌ができ、癌組織の平均容積は 270 mm^3 であった。これに対し、固定Hepa 1-6細胞、アジュバントである Titer Max Gold、IL-2 マイクロスフェア、GM-CSF マイクロスフェアを含む腫瘍ワクチン処置群では5匹中4匹に全く腫瘍は認められず(表中では、tumor-free マウスの割合で表現してある)、肝癌が観察された1匹ではわずか 18 mm^3 の小さな腫瘍であった。腫瘍のワクチン療法の効果は明白である。

表 1

感作	tumor-free	腫瘍容積 (mm ³)	
	マウスの割合	(平均 ± SD)	レンジ
対照群			
(A) PBS	0/5	270 ± 146	140-480
処置群			
(B) 固定 Hepa 1-6 cells	4/5	3.6 ± 8	0-18
+Titer Max Gold			
+IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			

次に、腫瘍ワクチンの構成成分の組み合わせの重要性を判定するため、処置群のなかで腫瘍ワクチン成分を変化させた。表 2 にその結果を示す。対照群(A)と処置群(E)は表 1 の場合と同様な結果となり、再現性が認められた。

表 2

感作	tumor-free	腫瘍容積 (mm ³)	
	マウスの割合	(平均 \pm SD)	レンジ
対照群			
(A) PBS	0/5	420 \pm 326	144-910
処置群			
(B) PBS	0/5	152 \pm 106	75-294
+ 固定 Hepa 1-6 cells			
+ Titer Max Gold			
(C) PBS	0/5	67 \pm 97	18-240
+ 固定 Hepa 1-6 cells			
+ Titer Max Gold			
+ IL-2 マイクロスフェア			
(D) PBS	2/5	32 \pm 43	0-105
+ 固定 Hepa 1-6 cells			
+ Titer Max Gold			
+ GM-CSF マイクロスフェア			
(E) 固定 Hepa 1-6 細胞	4/5	3.6 \pm 8	0-18
+ Titer Max Gold			
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			

この表中、処置群(B)では、固定 Hepa1-6 細胞とアジュバント Titer Max Gold のみを含む腫瘍ワクチンでマウスを感作したが、Tumor-free マウスは1匹も認められなかった。従って、併用すべきサイトカインの重要性は明らかである。処置群(C)では、固定 Hepa1-6 細胞とアジュバント Titer Max Gold のほかに IL-2 マ

イクロスフェアのみを含む腫瘍ワクチンを用いたが、同様に tumor-free マウスは 1 匹も認められなかった。しかし、発生した腫瘍サイズは全体として明らかに小さく、平均腫瘍容積は 67 mm^3 であり、対照群(A)の $1/6$ 以下にすぎなかった。従って、IL-2 マイクロスフェアの重要性は明らかである。また、処置群(D)では固定 Hepa1-6 細胞とアジュバント Titer Max Gold のほかに GM-CSF マイクロスフェアのみを含む腫瘍ワクチンを用いたが、マウス 2 匹が tumor-free となった。従って、GM-CSF マイクロスフェアの重要性は明らかである。しかしながら、tumor-free マウスは処置群(E)の tumor-free マウスの半数にとどまり、処置群(E)には及ばない成績となった。この結果から、サイトカイン IL-2 と GM-CSF の組み合わせが一層重要であることが判明した。

さらに、腫瘍抗原としての固定腫瘍細胞の必要性を検討し、アジュバントの効果を算定するために、固定腫瘍細胞を含まない腫瘍ワクチン、またはアジュバントを含まない腫瘍ワクチンを作製し、その効果を比較した。結果を表 3 に示す。

表 3

感作	tumor-free	腫瘍容積 (mm^3)	
	マウスの割合	(平均 \pm SD)	レンジ
対照群			
(A) PBS	0/5	231 \pm 146	120-480
処置群			
(B) PBS	0/5	174 \pm 149	60-432
+ Titer Max Gold			
(C) PBS	0/5	300 \pm 258	60-648
+ Titer Max Gold			
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			
(D) PBS	0/5	210 \pm 170	60-480
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			
(E) PBS	1/5	85 \pm 78	0-210
+固定 Hepa 1-6 cells			
(F) PBS	1/5	78 \pm 58	0-150
+固定 Hepa 1-6 cells			
+ Titer Max Gold			
(G) 固定 Hepa 1-6 cells	5/5	0	0
+ Titer Max Gold			
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			
(H) PBS	4/5	7 \pm 16	0-36
+固定 Hepa 1-6 cells			
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			

表 1 と同じ対照群(A)と処置群(G)は表 1 の場合と同様な結果ではあるが、処置群(G)では 5 匹全部が tumor-free マウスとなった。固定 Hepa 1-6 細胞を含まないがそれ以外は処置群(G)と同じく IL-2 マイクロスフェアと GM-CSF マイクロスフェア、ならびにアジュバント Titer Max Gold を含む腫瘍ワクチンで処理された処置群(C)では、すべてのマウスに大きな肝癌(平均 300 mm³)の生成が認められた。この結果から、固体微粒子状の腫瘍抗原が極めて重要であることが判明した。実際、処置群(E)に見られるように、PBS に固定 Hepa 1-6 細胞のみを加えた腫瘍ワクチンでも、1 匹が tumor-free となった。これに対し、固定 Hepa 1-6 細胞、IL-2 マイクロスフェア、GM-CSF マイクロスフェアを含むが、アジュバント Titer Max Gold を含まない処置群(H)では、4/5 が tumor-free マウスとなったものの、1 匹では小さいながらもはっきりした 36 mm³ の肝癌が生じた。従って、非特異的な免疫反応を惹起するアジュバントの効果も、十分配慮に値することが判明した。

これらの結果から、Hepa 1-6 細胞によるマウス肝癌の癌組織形成を阻止する腫瘍ワクチンとしては、固定 Hepa 1-6 細胞、IL-2 マイクロスフェア、GM-CSF マイクロスフェア、アジュバント Titer Max Gold の組み合わせが、抗腫瘍効果を発揮するためには、最も効果的であると結論された。

例 2 : 固定腫瘍組織からの微粒子化腫瘍抗原の作製法

固定腫瘍細胞を含む固定腫瘍組織を破砕して、微細な固体化腫瘍抗原を調製した。

[方法]

例 1 において、対照群(A)のマウスに使用した Hepa 1-6 細胞と同量をマウス大腿部皮下に移植し、3 週間後に生成された肝癌組織を摘出し、市販中性ホルマリン液に室温にて 3 日間浸漬して固定した。この組織を取り出し、眼科バサミにて径 1 mm 程度の細かいミンスとし、PBS を元の肝癌湿重量の 10 倍量加え、さらに氷冷しつつホモジェナイザー(ハイドルフ社製 DIAX-600、6G ゼネレーターシャフト)にて 30 秒間ホモジェナイズした。このホモジェナイズは氷冷するために間隔

を3分間以上あけながら5回繰り返した。このホモジェネート 1.2 ml を 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブにとり、エッペンドルフ微量高速遠心機にて 15,000 rpm、3分間遠心し、packed volume を計測した。計測は 50 μ l 以上の水を入れた 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブと比較して行った。また、残りのホモジェネートを半径12cmの水平ローターにて2000rpm、10分間遠心し、沈殿を得た。

この沈殿を 5 ml の 70%アルコールに懸濁して洗浄、2000rpm、10分間遠心し上清を除去した後、元の容量のPBSに再度懸濁した。これを、当初40メッシュのステンレス金網 (Sigma 社製、S0770、空隙サイズ 380 ミクロン) を通過させた。通過した懸濁液 1.2 ml を 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブにとり、微量高速遠心機にて 15,000 rpm、3分間遠心し、packed volume を計測した。計測は一定量の水を入れた 1.5-ml エッペンドルフ遠心チューブと比較して行った。

[結果]

固定肝癌組織から得たホモジェネート中の組織断片は非常に細かく、上述のメッシュ通過後は、通常の 22 G 規格以下の細い注射針を易々と通過できる微細さであった。回収細胞数は不明だが、回収 packed volume は目測にして明らかに Hepa 1-6 生細胞 10^7 個相当を越えており、上述のメッシュ通過前後の packed volume で計測した回収率は 78%であった。このホモジェネートは固体化された腫瘍細胞断片を含み、腫瘍ワクチンとしての必要量は十分あるため、微粒子化腫瘍抗原として用いることが可能である。

例 3 : In vitro 誘導 CTL の抗腫瘍効果

固定腫瘍細胞を標的として CTL を誘導した場合の腫瘍細胞殺傷活性と特異性を検討した。

[方法]

1. 固定腫瘍細胞

C57BL/6 マウスに発症したメラノーマ細胞 B16 の亜株 B16-F10 (American Type

Culture Collection (Bethesda, MA, USA)から入手) 10^8 ないし 10^9 個を 10%ホルマリン液に漬け、 4°C にて2ないし4週間固定した。これを 70%エタノール 30 ml で懸濁遠心洗浄後、さらに PBS にて3回懸濁遠心洗浄した。これを適量の 10%ウシ胎児血清を含む細胞培養用 MEM 培地に懸濁し、 37°C にて2～3日加温するか、または 60°C にて4時間加温した。さらにこれを遠心回収し(以下、この処理を行った細胞を「固定 B16-F10 細胞」という)、 5×10^8 個/ml となるように懸濁した。

2. In vitro 感作と腫瘍細胞殺傷活性による抗腫瘍効果の測定

何も感作していない C57BL/6 マウスの脾臓から、当業者に周知の方法により組織を軽く潰して脾臓細胞を得た。この大部分はリンパ球である。この 4×10^7 個を取り、 2×10^6 個の固定 B16-F10 細胞とともに、10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地にヒト IL- 1β (167 単位/ml), ヒト IL-2 (67 国際単位/ml), ヒト IL-6 (134 単位/ml) (いずれも Immunex 社製のもの) を添加した培養液で 10 日間培養し増殖させた。この培養液を培養開始後3日目及び5日目に全交換し、以後は2日置きに半分交換した。こうして増殖したリンパ球を CTL とした。

抗腫瘍効果測定として、in vitro で CTL の腫瘍細胞殺傷活性を測定した。細胞殺傷活性は、放射線照射をしていない生きている B16-F10 細胞を標的細胞にして、標準的な測定法として広く知られている4時間 Cr-51 遊離法により測定した。また、比較のため、標的細胞として例1で述べた Hepa 1-6 細胞、American Type Culture Collection (Bethesda, MA, USA)から入手した Lewis lung carcinoma 細胞を B16-F10 細胞の代わりに用いた。

[結果]

第1図に in vitro 感作によって誘導した CTL の活性を示した。縦軸の %Lysis は CTL による標的細胞の殺傷活性を表している。また、横軸の E/T ratio は、4時間 Cr-51 遊離法による殺傷活性測定時の CTL 数と標的細胞数の比である。B16-F10 細胞を標的とした場合 (□) は E/T ratio が 10 で約 20%を殺傷した。この活性は、同じ C57BL/6 マウス由来である他の2種類の腫瘍細胞を標的とした場合よりも、明らかに高かった。この結果は、固定 B16-F10 細胞に対して誘導され

た CTL は、同じ C57BL/6 マウス由来でありながら、他の 2 種類の腫瘍細胞よりも特異的に生きている B16-F10 細胞を認識して殺す能力があることを示唆している。

例 4：溶解固定腫瘍細胞からの微粒子化腫瘍抗原の作製法とその in vivo 抗腫瘍効果

病理切片を材料にする場合には、例 2 で示した方法で微粒子化すると収量が悪く、腫瘍ワクチンの作製が困難になる場合がある。そのような場合には、以下のようにして固定腫瘍細胞を消化酵素で溶解し、これをマイクロスフェア製剤とし、サイトカインのマイクロスフェア製剤と組み合わせて腫瘍ワクチンを製造することができる。

[方法]

1. 溶解固定腫瘍マイクロスフェアの作製法と腫瘍ワクチン製剤の作製法

固定 B16-F10 細胞を 5×10^8 個/ml となるように PBS に懸濁した。これに pronase K (Sigma 社) を 1 mg/ml となるように添加し、56°C にて一夜加温した。3000 rpm, 10 分間の遠心にて沈殿を除去し、上清を溶解 B16-F10 抗原とした。この上清に例 1 で用いたヒト血清アルブミン注射液を添加し、最終アルブミン濃度が 2.5% となるように調製した。これ以下の操作は例 1 の GM-CSF マイクロスフェアの作製手順と同じとし、溶解固定腫瘍マイクロスフェアを作製した。最終的には 80 μ l の生理食塩水に懸濁されたマイクロスフェアに含まれる腫瘍抗原量が 10^7 個の腫瘍細胞数に相当するように希釈した。これに、例 1 と同じ方法で調製した GM-CSF マイクロスフェア 20 μ l を混合し、腫瘍ワクチン製剤とした。

2. In vivo 感作と腫瘍細胞チャレンジによる抗腫瘍効果の測定

B16-F10 細胞とは同系 (syngeneic) の関係にある 6-8 週齢の C57BL/6 雄マウス (1 群 10 匹) をエーテル麻酔し、26 G 注射針を使って腫瘍ワクチン製剤をマウスの大腿部の皮内に 1 匹あたり 100 μ l を注射した。対照群には PBS を同量注射した。腫瘍ワクチン投与を繰り返す場合は、隔週に同量の投与を繰り返した。初回の腫

瘍ワクチン投与 2 週間後、腹部皮下に懸濁した培養 B16-F10 生細胞 10^5 個を注射した。抗腫瘍効果は残存 tumor-free マウスの%で算出した。

[結果]

第 2 図には in vivo 感作実験の結果を示した。対照群に比べて、腫瘍ワクチン製剤投与群の残存 tumor-free マウスは明らかに高い%を示した。特に、この腫瘍ワクチン製剤を 3 回投与した群では、観察期間が 90 日を越えてもなお半数のマウスが tumor-free の状態を保っていた。この結果は、in vivo でも腫瘍ワクチン製剤投与によって B16-F10 細胞に対する CTL が誘導され、そのため後から注射した生きている B16-F10 細胞が殺傷され、半数のマウスで生着しなかったことを示唆している。また、この結果は、腫瘍の摘出手術後、その腫瘍細胞を用いて腫瘍ワクチン製剤を製造すれば、腫瘍の再発を防止できる腫瘍ワクチン療法が成立し得ることを示唆している。

例 5 : 溶解固定腫瘍細胞から作製した腫瘍ワクチン製剤の CTL 誘導効果

例 4 で腫瘍ワクチンを投与した動物に、実際に in vivo で CTL が誘導されていることを in vitro で検証した。

[方法]

例 4 と同じ方法で腫瘍ワクチン製剤を投与した C57BL/6 雄マウス、対照群のマウス、及び別種の対照群として、例 4 における腫瘍ワクチン製剤 1 回投与群の代わりに、X-線 50Gy をあらかじめ照射した生きている B16-F10 細胞 10^7 個と GM-CSF マイクロスフェア $20\mu\text{l}$ を混合して対照腫瘍ワクチン製剤として投与した群のマウスを使用した。これらから脾臓と鼠径リンパ節を取り出し、組織を軽く潰してリンパ球を得た。これらのリンパ球を 10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地にヒト IL- 1β (167 単位/ml) , ヒト IL-2 (67 国際単位/ml) , ヒト IL-6 (134 単位/ml) (いずれも Immunex 社製のもの) を添加した培養液で 7 日間培養し増殖させた。この実験系は、培養期間中に固定 B16-F10 細胞による刺激を一切加えていない点で例 3 の系と異なっている。これによって、培養期間中に CTL が誘導される

可能性はなく、体内で誘導された CTL 数に比例した数の CTL が *in vitro* で増殖すると期待できる。培養リンパ球の細胞殺傷活性は、放射線照射をしていない生きている B16-F10 細胞を標的にして、標準的な測定法として広く知られている 4 時間 Cr-51 遊離法により測定した。

[結果]

培養リンパ球と標的腫瘍細胞の比 (E/T ratio) を変えて細胞殺傷活性を検討した。第 3 図にその結果を示す。例 4 と同じ方法で腫瘍ワクチン製剤を *in vivo* 投与したマウス由来のリンパ球による処理群では、殺傷された標的の B16-F10 細胞の割合が明らかに高い。このリンパ球の腫瘍細胞殺傷活性は、CTL を誘導できることが明らかにされている既存の方法である別種の対照群 (対照腫瘍ワクチン製剤を投与したマウス) 由来のリンパ球の細胞殺傷活性とほぼ同等であった。この結果はマウス体内で B16-F10 細胞に対する CTL が誘導されていることを示唆している。また、この結果から、CTL には高い腫瘍細胞殺傷能力があるが故に、一旦 CTL が誘導されれば、*in vivo* でも既存の腫瘍細胞を殺せると推定され、腫瘍の転移防止、腫瘍の治癒が期待できる。

例 6 : 溶解固定腫瘍細胞から作製した腫瘍ワクチンの CTL 誘導効果-HA-20 細胞を用いた場合

本発明により誘導され得る CTL が、抗原とした腫瘍 B16-F10 細胞一種に限定されるものではないことを確認した。

[方法]

HA-A20 細胞は Balb/c マウス由来の B リンパ腫細胞株である。この細胞を遺伝子操作により改変した GM-CSF-HA-A20 細胞は、influenza-hemagglutinin とマウス GM-CSF の二つの遺伝子の発現ベクターを導入した安定細胞株で、古典的な GM-CSF 産生性生細胞型腫瘍ワクチンとして研究材料になっている (Levitsky, H.I., et al., J. Immunol., 156, pp.3858-3865, 1996)。B16-F10 細胞の代わりに野生型 HA-A20 細胞を用い、例 4 と同様な方法で、GM-CSF マイクロ

スフェア $20\mu\text{l}$ を混合した腫瘍ワクチン製剤を作製し、Balb/c マウスの感作に使用した。このとき、対照群として PBS 投与群、X-線 50Gy をあらかじめ照射した生きている HA-A20 細胞 10^7 個投与群、GM-CSF マイクロスフェアを混合していない腫瘍ワクチン製剤投与群、ならびに X-線 50Gy をあらかじめ照射した生きている GM-CSF-HA-A20 細胞 10^7 個投与群を作製した。

Balb/c マウスの感作は例 4 の場合と同じく 1 回投与により行なった。そして、B16-F10 細胞の代わりに野生型 HA-A20 細胞を用い、例 5 の場合と同じ方法で HA-A20 細胞に対する CTL 活性を測定した。また、典型的 CTL の細胞表面抗原として知られるマウス CD8 に対するモノクローナル抗体 (Sigma 社製、Product No. F7525、 $5\mu\text{g}$) を、標準的な測定法として広く知られている 4 時間 Cr-51 遊離法により測定する際に同時に 96 ウェルプレート中の各ウェルに添加した試験も併行して行った。

[結果]

第 4 図に示すように、対照群のうち、PBS 投与群、(X-線 50Gy をあらかじめ照射した生きている)HA-A20 細胞投与群、GM-CSF マイクロスフェアを混合していない腫瘍ワクチン製剤投与群では細胞殺傷活性がほとんど認められなかった。一方、GM-CSF マイクロスフェア $20\mu\text{l}$ を混合した腫瘍ワクチン製剤投与群では明らかな標的の野生型 HA-A20 細胞殺傷活性があり、この強さは古典的な GM-CSF 産生性生細胞型腫瘍ワクチンとして知られる (X-線 50Gy をあらかじめ照射した生きている) GM-CSF-HA-A20 細胞投与群とほぼ同様であった。しかも、E/T ratio を 64 として、マウス CD8 に対するモノクローナル抗体を添加した場合、第 5 図に示すように、細胞殺傷活性は明らかに阻害された。これは細胞殺傷活性が CD8 陽性リンパ球、すなわち典型的 CTL が含まれるリンパ球群によるものが大部分であることを示唆している。

例7：例2で作製した固定腫瘍組織からの微粒子化腫瘍抗原による in vivo 抗腫瘍効果

[方法]

例2において作製した微粒子化腫瘍抗原でパクトボリュームにして 10 μ l 分を、例1において用いた固定腫瘍細胞 1.25 \times 10⁶ 個の代わりに用いて、例1の表1の実験と同様の実験を行い、in vivo 抗腫瘍効果を測定した。ただし、培養 Hepa 1-6 生細胞をチャレンジする時は、例1では直接肝臓内に 10⁷ 個を注射したが、本実施例では左後肢皮下に 2 \times 10⁷ 個を注射し、腫瘍組織の成長速度を体外から計測した。しかも腫瘍のサイズの表し方は、当該研究分野の慣例に従って、容積ではなく皮下腫瘍の面積で表した。また同時に、同じ実験の中の1群として、アジュバントとして Titer Max Gold 20 μ l ではなく、市販のツベルクリン（日本ビーシー製造株式会社）20 μ l を代わりに用いた群を作製した。

[結果]

表4に示すように、対照群は3週間でHepa 1-6生細胞をチャレンジした6匹すべてのマウスに腫瘍を形成した。しかし、処置群のうち、例1の表1の(B)群に対応する、固定腫瘍細胞の代わりに微粒子化腫瘍抗原を用いた群では、6匹中3匹のマウスに腫瘍を形成しただけであり、3匹(50%)で抗腫瘍効果が観察された。また、この微粒子化腫瘍抗原群でアジュバントをツベルクリンとした群では6匹中わずかに1匹のマウスに腫瘍を形成しただけであり、抗腫瘍効果は83%に高まった。

これらの結果から、癌組織形成を阻止する腫瘍ワクチンとしては、固定腫瘍組織から作製した微粒子化腫瘍抗原、IL-2 マイクロスフェア、GM-CSF マイクロスフェア、アジュバントとして Titer Max Gold もしくはツベルクリンの組み合わせでも、抗腫瘍効果を発揮するために十分効果的であると結論された。

表 4

感作	tumor-free	腫瘍面積 (mm ²)	
	マウスの割合	(平均 ± SD)	レンジ
対照群			
(A) PBS	0/6	164 ± 76	81-256
処置群			
(B) 固定腫瘍組織からの			
微粒子化腫瘍抗原	3/6	70 ± 80	0-180
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			
+ Titer Max Gold			
(C) 固定腫瘍組織からの			
微粒子化腫瘍抗原	5/6	8.2 ± 20	0-49
+ IL-2/GM-CSF マイクロスフェア			
+ ツベルクリン			

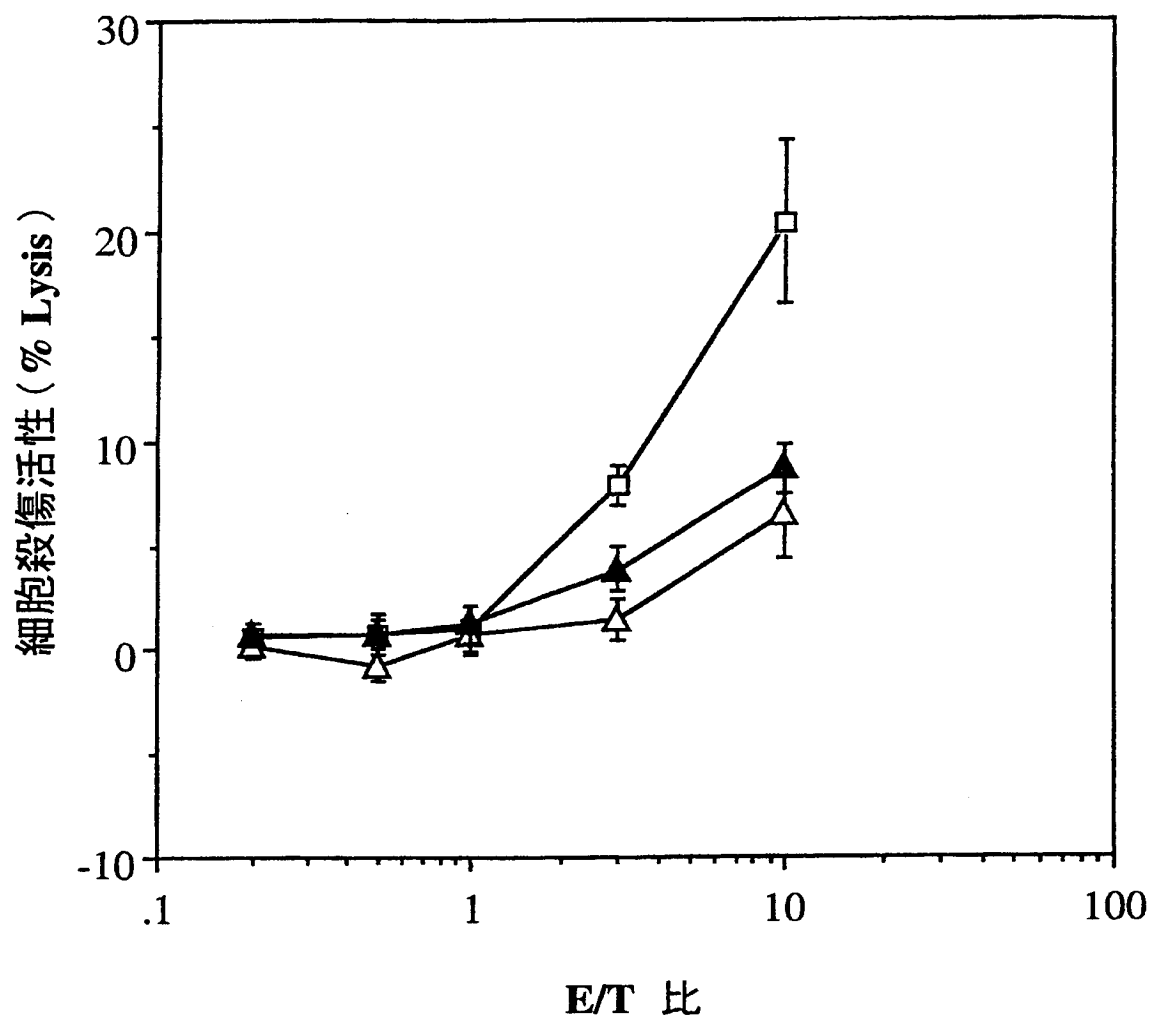
産業上の利用可能性

本発明の腫瘍ワクチンは簡便に製造でき、腫瘍の種類を問わずに再発防止、転移阻害、及び治療に適用できる汎用性を有しており、しかも抗腫瘍効果に極めて優れているという特徴を有している。

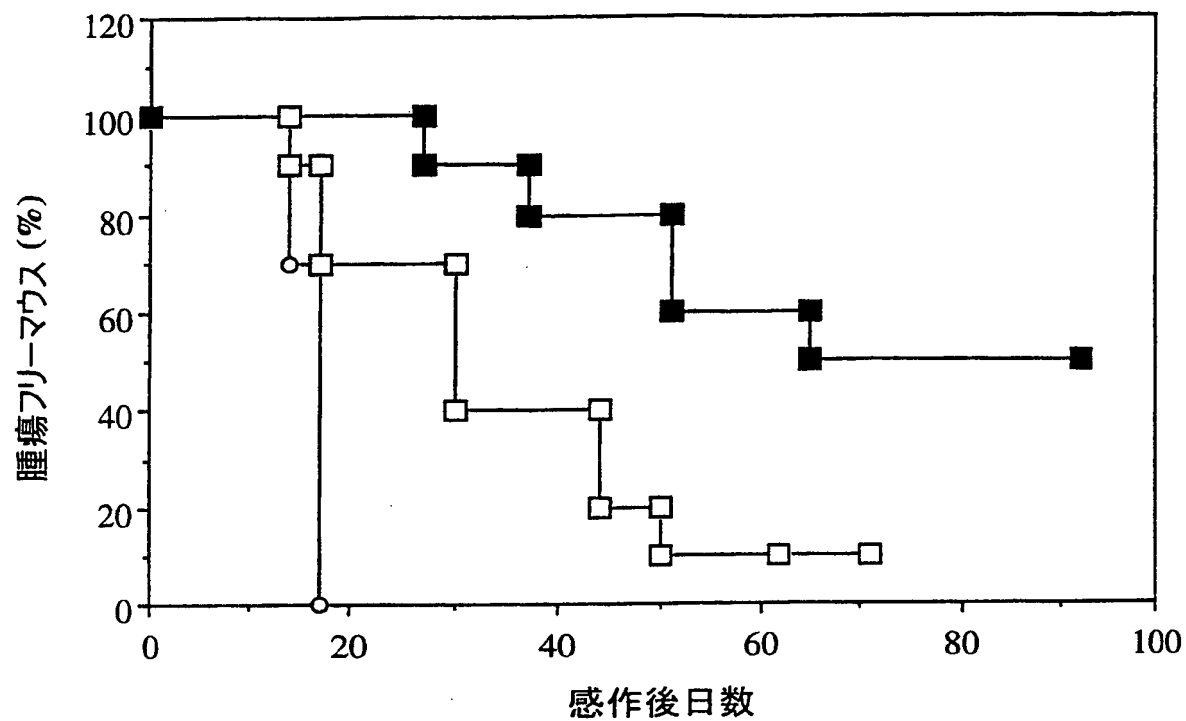
請求の範囲

1. 腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された微粒子と、少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤とを含む腫瘍ワクチン。
2. 腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された溶解物と、少なくとも一種類のサイトカイン及び／又はサイトカイン誘導剤とを含む腫瘍ワクチン。
3. アジュバントをさらに含む請求の範囲第1項又は第2項に記載の腫瘍ワクチン。
4. サイトカインとして徐放性サイトカイン製剤を含む請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の腫瘍ワクチン。
5. サイトカインとして顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子及び／又はインターロイキン-2を含む請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の腫瘍ワクチン。
6. 少なくとも一種類のサイトカインと組み合わせて用いるための腫瘍ワクチンであって、腫瘍組織、腫瘍細胞、及びこれらの成分からなる群から選ばれる固体化された腫瘍材料から調製された微粒子又は該腫瘍材料から調製された溶解物を有効成分として含む腫瘍ワクチン。

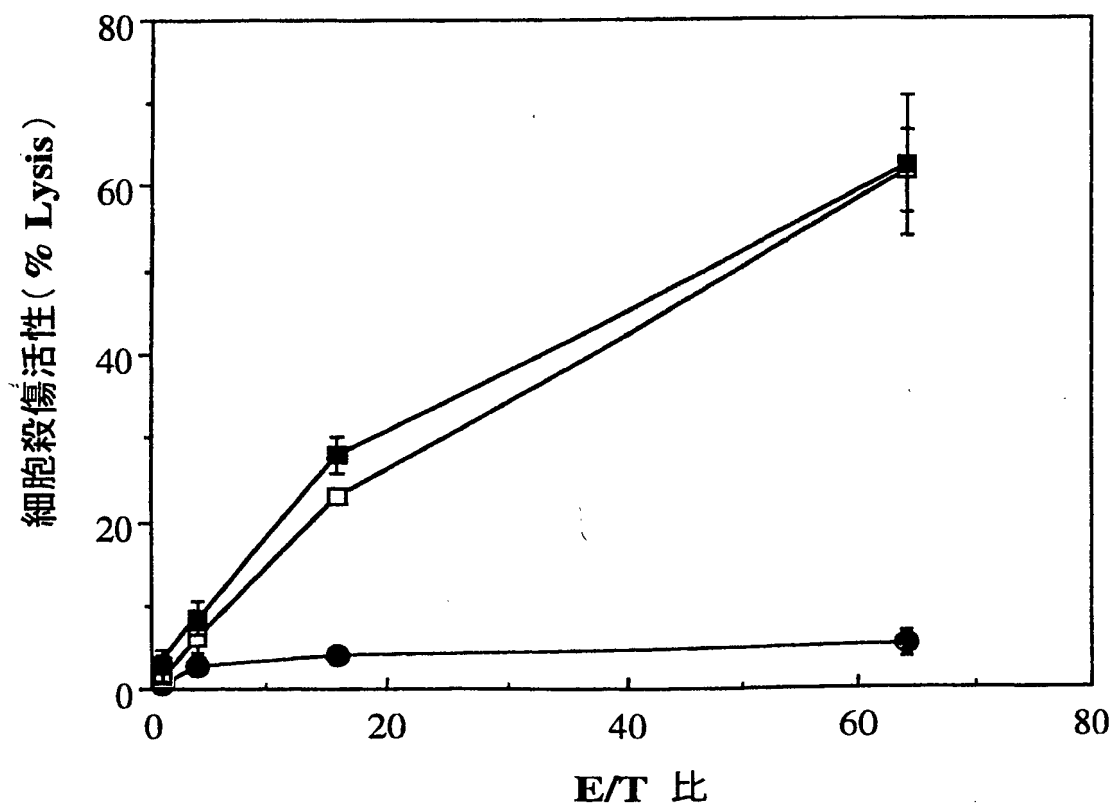
第1図



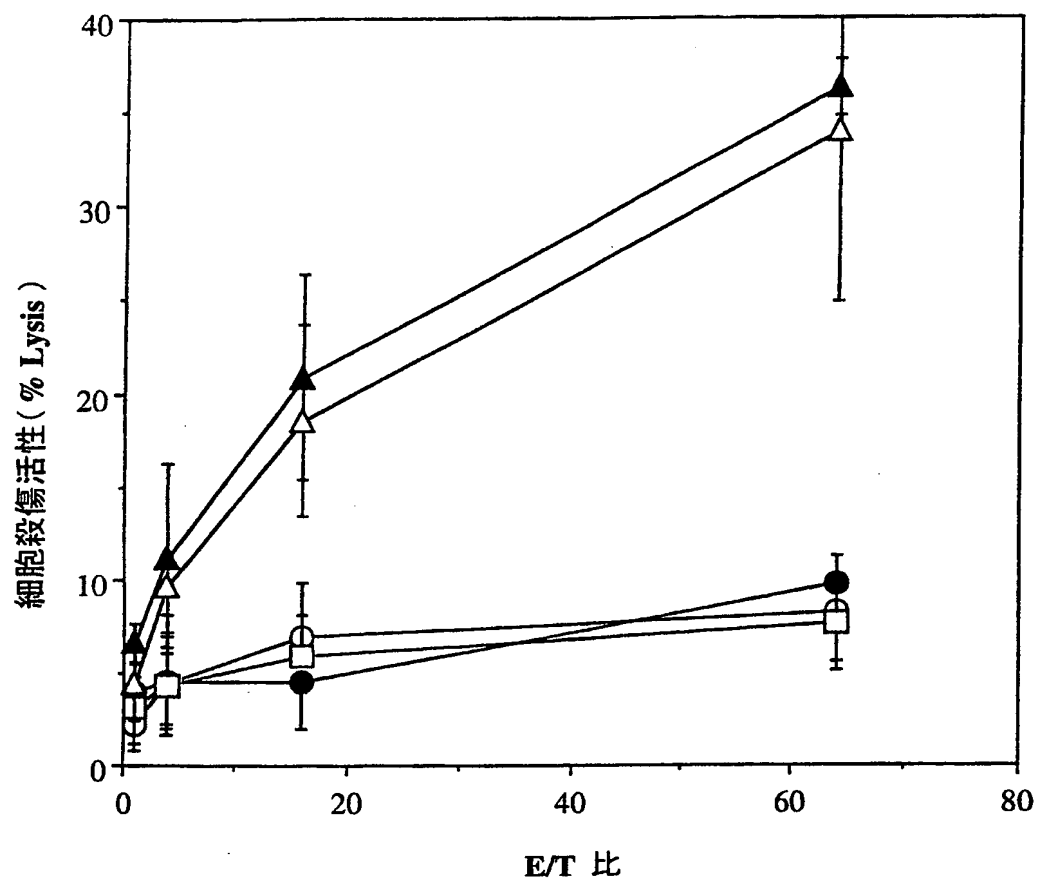
第2図



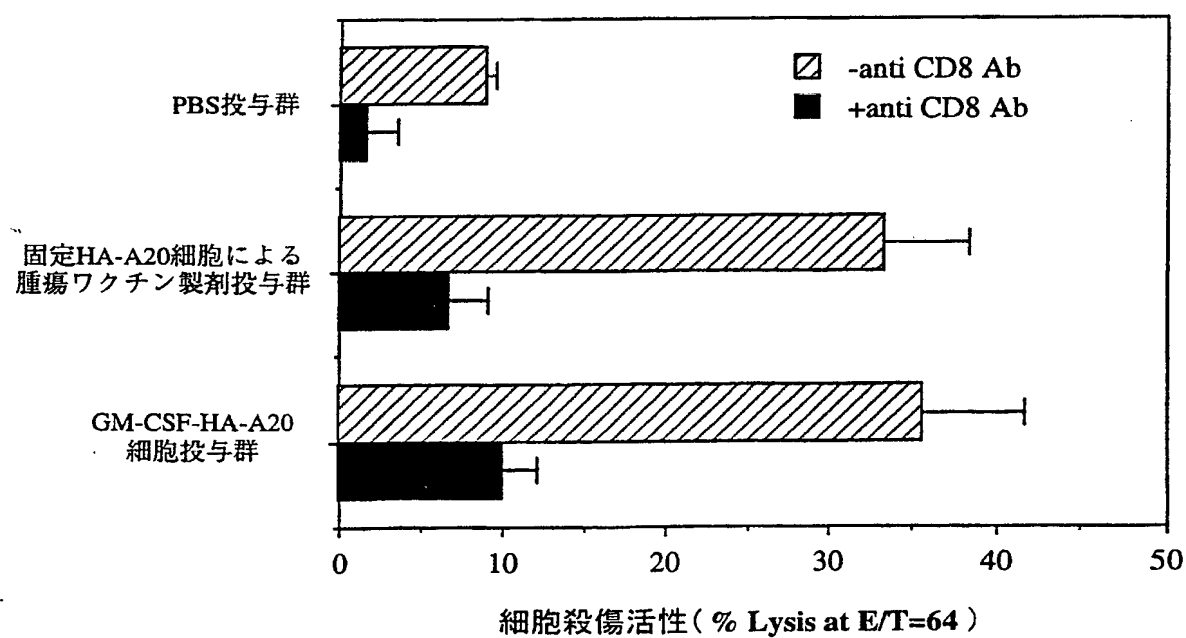
第3図



第4図



第5図



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building, 5th Floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2000 (01.03.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A01047M	International application No. PCT/JP00/00692

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

RIKEN et al (for all designated States except US)
OHNO, Tadao et al (all designated States)
LEONG, Kam et al (for US)

International filing date : 09 February 2000 (09.02.00)
Priority date(s) claimed : 09 February 1999 (09.02.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 25 February 2000 (25.02.00)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : CA, CN, US

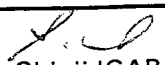
ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:  Shinji IGARASHI</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年02月09日 (09.02.2000) 水曜日 10時08分52秒

0	受理官庁記入欄 国際出願番号.	
0-1		
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際 出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)
0-4-1		
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理 官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A01047M
I	発明の名称	腫瘍ワクチン
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	
II-4ja	名称	理化学研究所
II-4en	Name	RIKEN
II-5ja	あて名:	351-0198 日本国 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号
II-5en	Address:	2-1, Hirosawa Wako-shi, Saitama 351-0198 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人である (applicant only)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	
III-1-4ja	名称	ジョンズホプキンス大学
III-1-4en	Name	JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
III-1-5ja	あて名:	21205 アメリカ合衆国 メリーランド州 バルチモア ルットランド アベニュー 7 2 0
III-1-5en	Address:	720 Rutland Avenue Baltimore, MD 21205 United States of America
III-1-6	国籍 (国名)	アメリカ合衆国 US
III-1-7	住所 (国名)	アメリカ合衆国 US

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年02月09日 (09.02.2000) 水曜日 10時08分52秒

III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja III-2-5en III-2-6 III-2-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) すべての指定国 (all designated States) 大野 忠夫 OHNO, Tadao 300-1234 日本国 茨城県 牛久市 中央1丁目18番地12 18-12, Chuo 1-chome Ushiku-shi, Ibaraki 300-1234 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1 III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja III-3-5en III-3-6 III-3-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) すべての指定国 (all designated States) ペン バオガン PENG, Bao Gang 305-0074 日本国 茨城県 つくば市 高野台3丁目1番地1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内 c/o RIKEN, TSUKUBA LIFE SCIENCE CENTER 1-1, Koyadai 3-chome Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0074 Japan 中華人民共和国 CN 日本国 JP
III-4 III-4-1 III-4-2 III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja III-4-5en III-4-6 III-4-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) レオン カム LEONG, Kam 21043 アメリカ合衆国 メリーランド州 エリコットシティ ブレコンシャイア ロード 10242 10242 Breconshire Road Ellicott City, MD 21043 United States of America アメリカ合衆国 US アメリカ合衆国 US



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年02月09日（09.02.2000）水曜日 10時08分52秒

III-5	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-5-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	
III-5-4ja	氏名(姓名)	リュウ シュウチン
III-5-4en	Name (LAST, First)	LIU, Shu Qin
III-5-5ja	あて名:	21211 アメリカ合衆国 メリーランド州 バルチモア ビーチ アベニュー 3522、アパートC
III-5-5en	Address:	3522 Beech Avenue, Apt. C Baltimore, MD 21211 United States of America
III-5-6	国籍 (国名)	中華人民共和国 CN
III-5-7	住所 (国名)	アメリカ合衆国 US
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	今村 正純
IV-1-1en	Name (LAST, First)	IMAMURA, Masazumi
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋1丁目5番5号 KRFビル5階
IV-1-2en	Address:	5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3271-1331
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3271-1410
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾
IV-2-1en	Name(s)	SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	CA CN US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年02月09日（09.02.2000）水曜日 10時08分52秒

VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年02月09日（09.02.1999）	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-031197	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書	25	-
VIII-3	請求の範囲	1	-
VIII-4	要約	1	a01047m.txt
VIII-5	図面	3	-
VIII-7	合計	35	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状		-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年02月09日（09.02.2000）水曜日 10時08分52秒

10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2000年02月09日 (09.02.2000) 水曜日 10時08分52秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号.			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A01047M		
2	出願人	理化学研究所		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000	
12-3	国際手数料			
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,000		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	5		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100		
12-6	合計の手数料 b2	5,500		
12-7	b1 + b2 = B	51,500		
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	4		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 8)	4		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	9,900		
12-11	合計の指定手数料 D	39,600		
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-14,200		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	76,900	
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	1		
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500		
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,500	
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	173,400	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙		

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9 6 2 1 弁理士 今村正純
13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2000年02月09日 (09.02.2000) 水曜日 10時08分52秒

13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定からはずされています: AP:(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); EA:(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); OA:(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG); AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CH, LI, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW) 確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
		Yellow 添付書類”別個の記名押印された委任状”が含まれていません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

